

鱼皮胶原蛋白中透明质酸酶抑制肽的制备工艺优化

Optimization for preparation of collagen peptide with hyaluronidase inhibition activity by response surface method

韩秋煜^{1,2,3}

石崎松一郎²

包 斌^{1,3}

HAN Qiu-yu^{1,2,3}

ISHIZAKI Shioichiro²

BAO Bin^{1,3}

(1. 上海海洋大学食品学院, 上海 201306; 2. 东京海洋大学海洋技术研究科, 日本 东京 1080075;

3. 食品科学与工程国家级实验教学示范中心[上海海洋大学], 上海 201306)

(1. College of Food Science and Technology, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;

2. Graduate School of Marine Science and Technology, Tokyo University of Marine Science and

Technology, Tokyo 1080075, Japan; 3. National Experimental Teaching Demonstration Center for

Food Science and Engineering [Shanghai Ocean University], Shanghai 201306, China)

摘要:目的: 高效提取胶原蛋白中的透明质酸酶抑制肽。

方法:以剑鱼(*Xiphias gladius*)鱼皮为原料, 使用胃蛋白酶提取酶溶性胶原蛋白并使用盐析法进行纯化, 经聚丙烯酰胺凝胶电泳鉴定胶原蛋白种类; 通过单因素和响应面法优化透明质酸酶抑制肽的提取工艺。**结果:**使用胃蛋白酶提取的胶原蛋白为 I 型胶原, 透明质酸酶抑制性胶原蛋白肽的优化提取条件为复合酶比($m_{\text{胶原蛋白酶}} : m_{\text{蛋白酶}}$) 8 : 2, 酶解温度 32 ℃, 酶解时间 6 h, 加酶量 6%。在此条件下胶原蛋白肽的透明质酸酶抑制率为 42.35%, 响应面模型拟合性好, 透明质酸酶抑制率的预测值与实际值无显著差异($P > 0.05$)。**结论:**该工艺可应用于对剑鱼鱼皮中具有透明质酸酶抑制性的胶原蛋白肽的提取。

关键词: 胶原蛋白肽; 透明质酸; 剑鱼; I 型胶原

Abstract: Objective: The extraction process of collagen peptides from the skin of swordfish (*Xiphias gladius*) was optimized in order to efficiently obtain collagen peptides with hyaluronidase inhibition activity by single factor and response surface method. **Methods:** The response surface method was used to optimize the preparation of collagen peptide with hyaluronidase inhibition activity. In this paper, the enzyme-soluble collagen was extracted from swordfish skin by pepsin, and then the salting-out method was carried out to purify the collagen initially. The specie of collagen

was identified by polyacrylamide gel chromatography with 7.5% separation gel. After the basic test carried out by single-factor method according to the degree of hydrolysis and hyaluronidase inhibition rate, the hyaluronidase inhibition rate was selected as the response value for the optimization of hydrolysis conditions of collagen peptide derived from the skin of swordfish via Box-Behnken response surface experimental method. **Results:** The results showed that the pepsin-soluble collagen was identified as the type I collagen. The optimized hydrolysis conditions for the type I collagen peptide with hyaluronidase inhibition activity were: 6 h of hydrolysis time, 8 : 2 of complex enzyme ratio, 32 ℃ of hydrolysis temperature and 6% of enzyme mixture addition. The hyaluronidase inhibition rate of the type I collagen peptide under these conditions was 42.35%. According to the statistical analysis, the response surface model fitted well and there was no significant difference between the predicted and actual values of hyaluronidase inhibition rate ($P > 0.05$). **Conclusion:** Therefore, this hydrolysis process could be applied to the production of type I collagen peptide with hyaluronidase inhibition activity derived from the skin of swordfish.

Keywords: collagen peptide; hyaluronidase inhibition activity; swordfish; type I collagen

基金项目:上海市创新行动计划(编号:19440741200);国家自然科学基金(编号:82173731)

作者简介:韩秋煜,女,上海海洋大学在读硕士研究生。

通信作者:包斌(1965—),女,上海海洋大学副教授,硕士。

E-mail: bbao@shou.edu.cn

收稿日期:2021-05-18

低附加值的商品是鱼类副产物开发的主要目标市场,包括鱼粉^[1]、肥料、宠物食品等廉价商品。因此,将鱼副产物进行高值化利用,减少海洋生物资源浪费和环境污染的同时也为食品行业提供更多潜在的受益^[2]。由于陆生动物来源的胶原蛋白及其水解物会诱发疯牛病等疾病,存在使用风险^[3],而含有 30%~40% 胶原蛋白的鱼类

副产物则被认为是其良好的替代品^[4-5]。剑鱼因鱼体较大,在加工过程中产生的大量废弃副产物(鱼皮)可为制备胶原蛋白提供丰富的原料来源。

透明质酸(Hyaluronic acid, HA)是存在于细胞外基质中的糖胺聚糖,由 N-乙酰葡萄糖胺和葡萄糖醛酸的重复单元组成^[6]。当癌症、炎症、氧化应激发生时,细胞外基质的动态平衡被破坏,内源性高分子量 HA 被透明质酸酶和活性氧迅速降解,导致低分子量(≤ 250 kDa)的 HA 增加,刺激促炎细胞因子产生^[7],继而增加疾病发生的风险。因此 HA 的合成和降解之间的平衡是维护健康的重要因素。

肽活性的产生是由于其前体受外源酶水解或胃肠消化^[8-9]。因其良好的生物活性、生物相容性和安全性^[10-11],胶原蛋白肽已被广泛应用于抗高血压^[12]、抗氧化^[13]、抗肿瘤^[14]和化妆品^[15]等领域。Arunkumar 等^[16]研究发现,褐藻(*S. tennerimum*)叶片提取物中单宁含量较高,有较高的透明质酸酶抑制率(37.67 ± 2.30)%。Aryani 等^[17]发现科兰当鱼尾鳍的乙酸乙酯提取物具有较好的透明质酸酶抑制性(IC_{50} 为 4 mg/mL)及一定的抗过敏作用。但是有关鱼皮胶原蛋白肽的透明质酸酶抑制性研究较少,其提取工艺的优化尚未见报道。

试验拟以剑鱼鱼皮为原料,利用酶解法提取胶原蛋白中的胶原蛋白肽,通过响应面试验优化其提取工艺,并比较胶原蛋白肽粗提物和胶原蛋白透明质酸酶的抑制性,旨在为从剑鱼中提取具有潜在生物活性的胶原蛋白肽提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

剑鱼(*Xiphias gladius*):将鱼体运入实验室后于 4 °C 下保存至少 6 h,分离鱼皮及鱼肉并切碎,处理后立即放入-85 °C 冰箱贮存,直至试验开始(剑鱼种类已由实验室进行鉴定, *X. gladius*),日本宫城县气仙沼市鱼市场;

蛋白酶、木瓜蛋白酶、三硝基苯磺酸、透明质酸、牛血清白蛋白、透明质酸酶、胃蛋白酶(1:10 000)、氢氧化钠、乙酸、盐酸、氯化钠、三羟甲基氨基甲烷、异丙醇羟脯氨酸、氯胺 T、 ρ -二甲氨基苯甲醛、异丙醇:日本大阪和光纯药工业株式会社;

胰蛋白酶、 α -凝乳蛋白酶、胶原酶、L-亮氨酸、十二烷基硫酸钠:美国 Sigma 公司;

马弗炉:TMF-4000 型,日本东京理化器械株式会社;

磁力搅拌器:RCH-1000 型,日本东京理化器械株式会社;

冷冻离心机:CR22N21N 型,日立株式会社;

冷冻干燥机:FD-1000 型,日本东京理化器械株式会社。

1.2 原料理化成分分析

1.2.1 水分含量 采用比重法^[18]。

1.2.2 粗蛋白含量 采用凯氏定氮法,计算时换算系数

取 6.25。

1.2.3 灰分含量 用马弗炉于 550 °C 下焚烧 16 h。

1.3 胶原蛋白提取

将鱼皮或鱼肉均质后,于 0.1 mg/mL 的 NaOH 中浸泡 48 h 以脱去非胶原蛋白,过滤清洗至中性,将固形物置于 10%异丙醇中 36 h 以脱脂,每隔 6 h 更换浸泡液。将脱脂和脱非胶原蛋白的鱼皮或鱼肉清洗至中性,以 $m_{\text{鱼皮或鱼肉}} : V_{\text{醋酸溶液}}$ 为 1:40 (g/mL) 于含有质量分数 0.1%胃蛋白酶的 0.5 mg/mL 醋酸溶液中浸泡 48 h, 10 000 r/min 离心 60 min。将 NaCl 加入上清液中进行盐析,至终质量浓度为 1.2 mg/mL,并保存过夜。10 000 r/min 离心 60 min,将沉淀以 1:10 (g/mL) 完全溶解于 0.5 mg/mL 醋酸溶液中,用 0.1 mg/mL NaOH 溶液调节 pH 值至 7,加入 NaCl 至终质量浓度为 2.4 mg/mL 后保持过夜。4 °C、12 000 r/min 离心 40 min,收集沉淀物并于 0.5 mg/mL 醋酸溶液中复溶,用 2.4 mg/mL NaCl 盐析出的沉淀物即为酶溶性胶原蛋白(PSC)。将胶原蛋白溶于 0.5 mg/mL 醋酸溶液中,先使用 0.1 mg/mL 醋酸溶液透析 24 h,用冷蒸馏水透析至少 48 h。PSC 溶液冻干后于-25 °C 保存。

1.4 聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)

根据 Laemmli^[19]的方法稍作修改。将胶原蛋白样品溶于 0.5 mg/mL 的醋酸溶液中,使其终质量浓度为 2 mg/mL,85 °C 孵育 1 h,25 °C、5 000 r/min 离心 5 min,除去不可溶解的碎片。上清液置于 β -巯基乙醇中,与 2 倍浓度上样缓冲液(60 mmol Tris-HCl, pH 8.0, 含 25%甘油,2% SDS,0.1% 溴酚蓝)以 $V_{\text{上清液}} : V_{\text{缓冲液}}$ 为 1:1 混合。在 7.5% 解析凝胶和 4% 堆积凝胶上进行 SDS-PAGE。用质量分数为 0.1%的考马斯亮蓝 R-250 染色 25 min,并使用微波法脱色。

1.5 水解度测定

采用 TNBS 法^[20]。

1.6 透明质酸酶抑制试验

根据 Meyer^[21]的方法稍作修改。将 25 μ L 样品与 25 μ L 30 U/mL 的透明质酸酶溶液混匀,37 °C 孵育 10 min。加入 50 μ L 质量分数为 0.04%的透明质酸溶液(溶解于 0.15 mg/mL NaCl—0.01 mg/mL 磷酸缓冲液中, pH 5.3),37 °C 孵育 45 min。加入 900 μ L 牛血清白蛋白(2.5 mg/mL),室温静置 10 min,于 540 nm 处测定吸光度。以超纯水和单宁酸分别作为阴性、阳性对照,所有试验测定 3 次。按式(1)计算抑制率。

$$R = \left[1 - \frac{(S - S_b) - (C - C_b)}{C - C_b} \right] \times 100\%, \quad (1)$$

式中:

R——抑制率, %;

S——样品吸光度;

S_b ——不含透明质酸酶的样品空白的吸光度;

C——对照的吸光度；

C_b——不含透明质酸酶的对照空白的吸光度。

1.7 胶原蛋白酶解响应面优化

根据单因素试验结果,选择具有较大影响的复合酶比(*m*_{胶原蛋白酶}:*m*_{蛋白酶})、酶解温度和酶解时间作为因素,以透明质酸酶抑制率作为响应因素,根据 Box-Behnken 原理优化胶原蛋白酶解工艺条件。

1.8 数据处理

采用 Office 365 和 SPSS 8.0 软件对数据进行处理及绘图;运用 Design-Expert 8.0.6 软件进行响应面试验设计与分析。

2 结果与分析

2.1 成分分析

由表 1 可知,鱼肉中的水分和蛋白质含量均显著高于鱼皮($P < 0.05$),但灰分含量占鱼皮的 10.60% (1.73 g/100 g)。产于西班牙的剑鱼(*X. gladius*)鱼皮中

的水分、蛋白质、灰分含量分别为 42.87, 16.28, 2.49 g/100 g^[22],而捕于广西钦州的野生马面鱼(*Navodon septentrionalis*)其粗蛋白含量(15.75%)^[23]低于宁波产的(36.73%)^[24],说明鱼种及生活水域影响鱼类的基本理化成分。异丙醇羟脯氨酸也可以作为量化某一组织中胶原蛋白含量的参数^[25]。假设组织中的异丙醇羟脯氨酸含量全部由胶原蛋白提供,以每 100 g 样品中含有 11.2 g 和 10.9 g 异丙醇羟脯氨酸作为鱼皮和鱼肉胶原蛋白的计算指标,剑鱼鱼皮中的胶原蛋白含量最高(11.03 mg/100 g),但低于鳕鱼皮(58.5 mg/100 g)^[26]。此外,鱼皮中异丙醇羟脯氨酸含量(0.99 mg/g)显著高于鱼肉(0.09 mg/g)($P < 0.05$)。从软骨中提取的大眼鲷的异丙醇羟脯氨酸含量为 5.71 mg/g,但鱼皮的为 19.5 mg/g^[27],表明鱼体中不同部位含有的异丙醇羟脯氨酸含量不同。鱼类之间胶原蛋白含量的差异可能取决于鱼的种类、环境^[26]和鱼体部位。

表 1 鱼皮和鱼肉组分分析[†]
Table 1 Proximate analysis of fish skin and muscle

样品	近似理化组分/(10 ⁻² g · g ⁻¹)			异丙醇羟脯氨酸 含量/(mg · g ⁻¹)	胶原蛋白含量* / (10 ⁻² mg · g ⁻¹)
	蛋白质	灰分	水分		
鱼肉	15.79±0.54 ^a	1.73±0.02 ^b	82.57±0.07 ^a	0.09±0.08 ^b	0.89±0.03 ^b
鱼皮	14.55±1.80 ^b	16.32±0.01 ^a	64.91±0.21 ^b	0.99±0.93 ^a	11.03±0.70 ^a

[†] 同列字母不同表示差异显著($P < 0.05$);*, 换算因子为 10.9 和 11.2,分别用于计算鱼皮和鱼肉的胶原蛋白含量。

2.2 SDS-PAGE 图谱

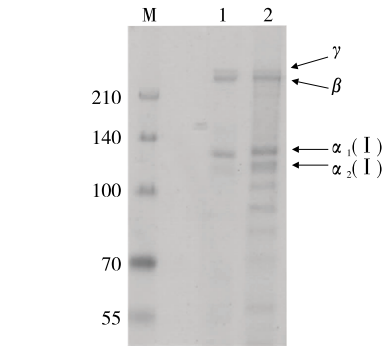
由图 1 可知,鱼皮和鱼肉 PSC 提取物的电泳图谱相似,均由 2 α_1 和 α_2 链组成,并含有微量的 β 链。由于 α_3 (I) 的电泳迁移位置与 α_1 (I) 相同,因此无法确认 α_3 链的存在^[28-29]。根据电泳迁移率和亚单位组成,认为图 1 所示的剑鱼鱼皮中提取的胶原蛋白为 PSC-I。 α_1 (I) 链(130 kDa)和 α_2 (I)链(120 kDa)的分子量略高于从鲤鱼皮中分离的 ASC-I (120,116 kDa)^[30],但与尼罗罗非鱼皮中分离的 ASC-I 和 PSC-I 分子量相近^[31],说明物种的不同影响了分子量。此外,剑鱼中提取的 PSC-I 对胃蛋白酶的敏感性较高,表现为鱼肉来源的胶原蛋白存在多个低于 100 kDa 的弱 α 亚单位。正常情况下,在胶原蛋白的 SDS-PAGE 模式中可观察到 β 带和 γ 带。但图 1 中的 β 带强度较低,所提胶原蛋白交联度较低。而交联度的变化可能是由于捕捞季节的不同,饥饿的鱼含有更高的高交联胶原蛋白(高分子量)^[25,29]。

2.3 胶原蛋白酶解工艺优化

2.3.1 水解度与透明质酸酶抑制率的相关性分析 由图 2 可知,水解度与透明质酸酶抑制率的相关指数为 0.719($P > 0.001$),非常显著,可以确定透明质酸酶抑制率与水解度之间存在显著正相关性,说明在一定范围内,胶原蛋白肽的水解度越高,透明质酸酶抑制率越高,二者呈

线性关系。因此,仅选择透明质酸酶抑制率作为响应面优化设计的相应指标,也可以得到具有较高可信度的结果。

2.3.2 响应面回归模型的建立及方差分析 在单因素试验的基础上,以复合酶比(*m*_{胶原蛋白酶}:*m*_{蛋白酶})、酶解温度和酶解时间为影响因素,以透明质酸酶抑制率为响应值,采用 Box-Behnken 设计对胶原蛋白酶解工艺进行优化,试验因素和水平见表 2,试验设计及结果见表 3。由表 3 可知,胶原蛋白肽的透明质酸酶抑制率为 18.98%~



M. 蛋白标品 1. 鱼皮胶原蛋白 2. 鱼肉胶原蛋白

图 1 剑鱼中 PSC-I 的 SDS-PAGE 图谱

Figure 1 SDS-PAGE pattern of PSC-I derived from swordfish

41.93%,最佳抑制率高于从鱿鱼中提取的胶原蛋白肽(32.21%)^[32],但低于蚕茧提取物(约52%)^[33]。

利用线性项和二次项的回归系数对表3进行多元回归拟合,得透明质酸酶抑制率与各酶解条件的二次回归方程为:

$$Y=40.12+1.91A-2.98B+1.57C-0.42AB-9.01AC+2.87BC-6.80A^2-8.09B^2-2.85C^2。$$
 (2)

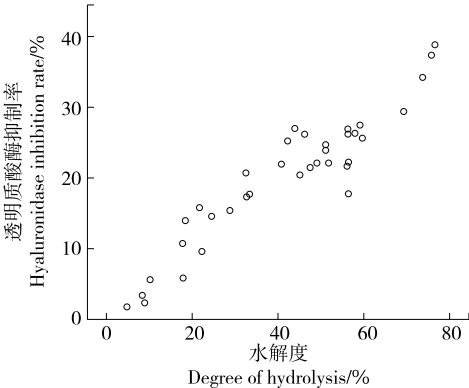


图2 水解度与透明质酸酶抑制率的相关性分析
Figure 2 Correlation analysis of DH and HAase inhibition rate

表2 响应面分析因素和水平

Table 2 Response surface analysis factors and levels

水平	A 复合酶比	B 酶解温度/℃	C 酶解时间/h
—1	6 : 4	30	6
0	7 : 3	35	7
1	8 : 2	40	8

表3 Box-Behnken 试验设计及结果

Table 3 Box-Behnken design with experimental results

试验号	A	B	C	透明质酸酶抑制率/%	预测值/%
1	0	1	—1	22.18	21.76
2	1	0	1	23.92	24.93
3	0	0	0	40.24	40.12
4	—1	1	0	19.33	20.76
5	1	—1	0	31.97	30.54
6	0	0	0	40.89	40.12
7	0	0	0	40.51	40.12
8	0	—1	1	30.42	30.80
9	—1	—1	0	27.11	25.88
10	1	0	—1	40.63	39.82
11	—1	0	—1	18.98	17.97
12	0	0	0	37.01	40.12
13	0	—1	—1	31.22	33.46
14	0	1	1	32.88	30.46
15	0	0	0	41.93	40.12
16	1	1	0	22.52	23.75
17	—1	0	1	38.33	39.14

由表4可知,模型F值为23.22,拟合性显著^[34];失拟项P值为0.252 5>0.05,不显著^[35]。因此,该模型的拟合值可以用来分析胶原蛋白肽的最佳水解条件。方差分析结果表明透明质酸酶抑制率受酶解时间的影响比酶解温度和复合酶比的更显著。

2.3.3 响应面交互分析 由图3可知,BC的响应面陡峭,说明酶解温度和酶解时间的相互作用显著;酶解时间和复合酶比有相对显著的交互作用,而酶解温度与复合酶比的交互作用相对较弱。

2.3.4 最佳工艺验证 根据响应面分析,从剑鱼鱼皮中得到PSC-I肽的最佳工艺条件为复合酶比(*m*_{胶原蛋白酶} : *m*_{蛋白酶})7.98 : 2.02,酶解温度31.70℃,酶解时间6.00 h。在此工艺条件下,理论预测I型胶原蛋白肽的透明质酸酶抑制率为41.06%。为方便操作,将最佳条件修正为复合酶比(*m*_{胶原蛋白酶} : *m*_{蛋白酶})8 : 2,酶解温度32℃,酶解时间6 h,此条件下的透明质酸酶抑制率为(42.35±0.06)% (*n*=3),与理论预测值的相对误差仅3.05%,说明建立的模型与实际较为吻合。经优化后,胶原蛋白的透明质酸酶抑制率显著高于阴性对照(2.32%)(*P*<0.05),但仅为阳性对照的0.51倍。由于粗肽的纯度不高,各肽段由于C端和N端的氨基酸序列不同,出现抑制作用。因此,该粗肽需进一步纯化筛选,以获得更高的透明质酸酶抑制活性。

3 结论

对剑鱼皮中I型胶原蛋白进行提取后,利用响应面法优化得到具有透明质酸酶抑制活性的胶原蛋白肽的最佳酶解条件为复合酶比(*m*_{胶原蛋白酶} : *m*_{蛋白酶})8 : 2,酶解温度32℃,酶解时间6 h,此条件下的透明质酸酶抑制率为

表4 回归模型的方差分析[†]

Table 4 Variance analysis of regression equation

来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值	显著性
模型	1 031.75	9	114.62	23.22	0.000 2	* *
A	29.22	1	29.22	5.92	0.045 2	
B	70.86	1	70.86	14.36	0.006 8	
C	19.66	1	19.66	3.98	0.086 2	
AB	0.70	1	0.70	0.14	0.718 2	
AC	325.08	1	325.08	65.85	< 0.000 1	
BC	33.06	1	33.06	6.70	0.036 1	* *
A ²	194.51	1	194.51	39.40	0.000 4	* *
B ²	275.35	1	275.35	55.78	0.000 1	* *
C ²	34.30	1	34.30	6.95	0.033 6	
残差	34.56	7	4.94			
失拟项	20.85	3	6.95	2.03	0.252 5	
纯误差	13.71	4	3.43			
总和	1 066.12	16				

[†] * 表示差异显著(*P*<0.05); * * 表示差异极显著(*P*<0.01)。

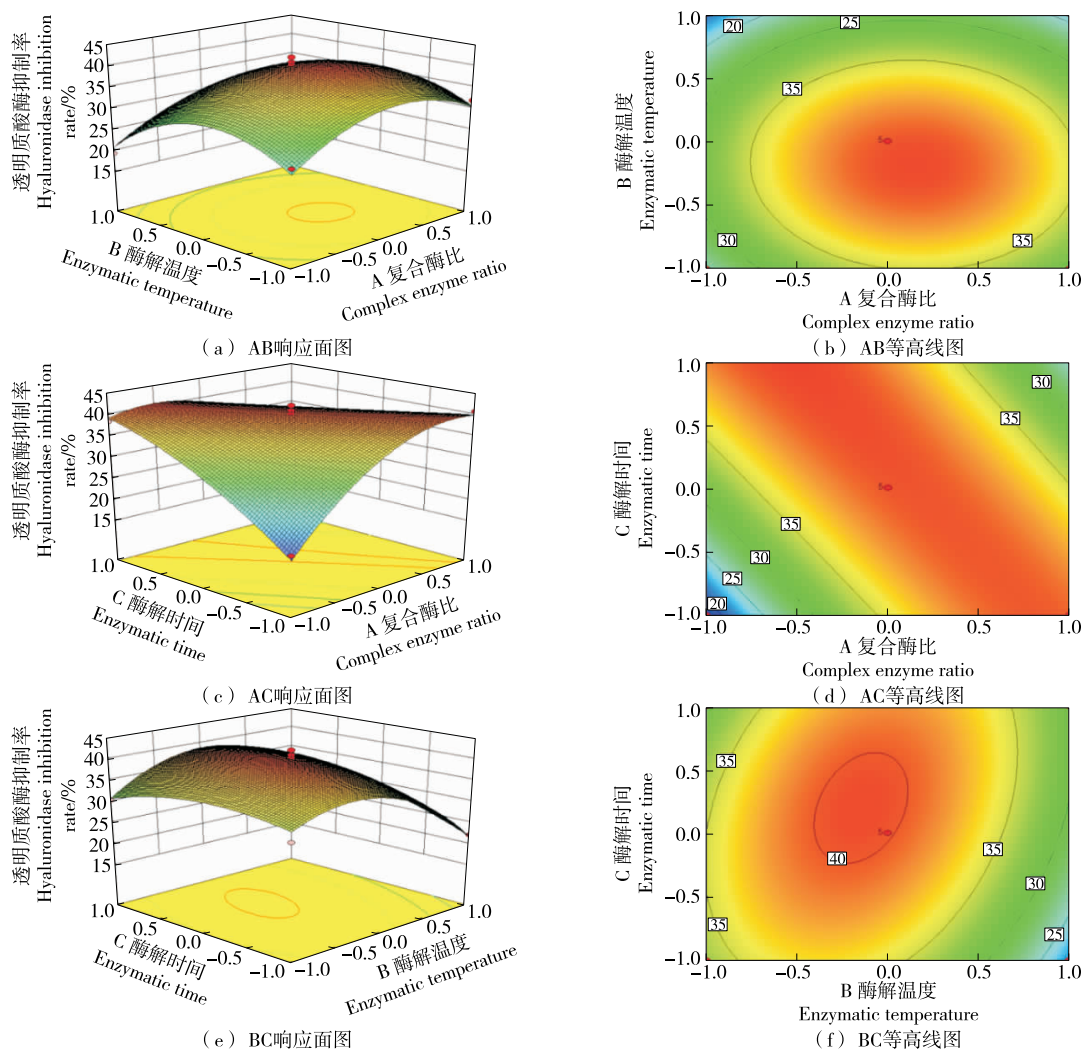


图3 各因素交互作用的响应面及等高线图

Figure 3 Response surface and contour plots of interactive effects

(42.35±0.06)% ($n=3$), 与理论预测值的相对误差为 3.05%, 说明建立的模型与实际较为吻合。但是胶原蛋白肽对透明质酸酶的抑制机理仍没有充分研究, 因此对该活性肽的进一步纯化和表征, 并分析其抑制机理将是下一步研究的方向。

参考文献

- [1] FAO. The state of world fisheries and aquaculture 2020[M]. FAO: Roma, 2020: 14.
- [2] MAEVE H, MARY M C, JIM O. Transforming beef by-products into valuable ingredients: Which spell/recipe to use? [J]. Frontiers in Nutrition, 2016, 3: 53.
- [3] 杨子帆, 张科, 刘莹, 等. 鲟鱼和草鱼鱼鳔酶溶性胶原蛋白的理化性质比较[J]. 食品工业科技, 2021, 42(15): 27-32.
YANG Zi-fan, ZHANG Ke, LIU Ying, et al. Comparison of physicochemical properties of pepsin-soluble collagens from swim bladders of Sturgeon (*Acipenser schrenckii*) and grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) [J]. Science and Technology of Food Industry, 2021, 42(15): 27-32.
- [4] KOIZUMI S, INOUE N, SHIMIZU M, et al. Effects of dietary supplementation with fish scales-derived collagen peptides on skin parameters and condition: A randomized, placebo-controlled, double-blind study[J]. International Journal of Peptide Research & Therapeutics, 2018, 24(3): 397-402.
- [5] KARAYANNAKIDIS P D, CHATZIANTONIOU S E, ZOTOS A. Effects of selected process parameters on physical and sensorial properties of yellowfin tuna (*Thunnus albacares*) skin gelatin[J]. Journal of Food Process Engineering, 2014, 37(5): 461-473.
- [6] WEIGEL P H, HASCALL V C, TAMMI M. Hyaluronan synthases[J]. Journal of Biological Chemistry, 1997, 272(22): 13 997-14 000.
- [7] NOBLE P W, LAKE F R, HENSON P M, et al. Hyaluronate activation of CD44 induces insulin-like growth factor-1 expression by a tumor necrosis factor-alpha-dependent mechanism in murine macrophages[J]. The Journal of Clinical Investigation, 1993, 91(6): 2 368-2 377.
- [8] CLARE D, SWAISGOOD H. Bioactive milk peptides: A prospectus[J].

- Journal of Dairy Science, 2000, 83(6): 1 187-1 195.
- [9] UDENIGWE C C. Bioinformatics approaches, prospects and challenges of food bioactive peptide research[J]. Trends in Food Science & Technology, 2014, 36(2): 137-143.
 - [10] 李东东. 罗非鱼皮多肽抗皮肤光老化作用研究[D]. 湛江: 广东海洋大学, 2018: 47.
LI Dong-dong. Study on anti-skin photoaging effect of Tilapia skin collagen polypeptide[D]. Zhanjiang: Guangdong Ocean University, 2018: 47.
 - [11] XU Lin-lin, DONG Wen-hong, ZHAO Jie, et al. Effect of marine collagen peptides on physiological and neurobehavioral development of male rats with perinatal asphyxia[J]. Marine Drugs, 2015, 13(6): 3 653-3 671.
 - [12] ALEMÁN A, GÓMEZ-GUILLÉN M, MONTERO P. Identification of ace-inhibitory peptides from squid skin collagen after in vitro gastrointestinal digestion[J]. Food Research International, 2013, 54(1): 790-795.
 - [13] 杨玉亮, 衣大龙, 刘春雨, 等. 体外模拟消化对牦牛骨胶原蛋白肽抗氧化活性的影响[J]. 食品与发酵工业, 2021, 47(13): 79-84.
YANG Yu-liang, YI Da-long, LIU Chun-yu, et al. Effects of in vitro simulated digestion on the antioxidant activity of yak bone collagen peptides[J]. Food and Fermentation Industries, 2021, 47(13): 79-84.
 - [14] ALEMÁN A, MARTÍNEZ-ALVAREZ O. Marine collagen as a source of bioactive molecules: A review[J]. The Natural Products Journal, 2013, 3(2): 105-114.
 - [15] VENKATESAN J, ANIL S, KIM S K, et al. Marine fish proteins and peptides for cosmeceuticals: A review[J]. Marine Drugs, 2017, 15(5): 143.
 - [16] ARUNKUMAR K, RAJ R, RAJA R, et al. Brown seaweeds as a source of anti-hyaluronidase compounds[J]. South African Journal of Botany, 2021, 139(9): 470-477.
 - [17] ARYANI A, SUPRAYITNO E, SASMITO B B, et al. Characterization and identification of charcoal of inedible Kerandang fish (*Channa pleurophthalma* Blkr) body parts and potential antiallergenic properties[J]. Veterinary World, 2020, 13(7): 1 480-1 486.
 - [18] CHEMISTS A O O A. Official method of analysis of AOAC International[M]. AOAC International: George W. Latimer, Jr. 1995: 314.
 - [19] LAEMMLI U K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4[J]. Nature, 1970, 227(5 259): 680-685.
 - [20] ADLER-NISSEN J. Determination of the degree of hydrolysis of food protein hydrolysates by trinitrobenzenesulfonic acid[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1979, 27(6): 1 256-1 262.
 - [21] MEYER K. The biological significance of hyaluronic acid and hyaluronidase[J]. Physiological Reviews, 1947, 27(3): 335-359.
 - [22] BLANCO M, VÁZQUEZ J A, PÉREZ-MARTÍN R I, et al. Hydrolysates of fish skin collagen: An opportunity for valorizing fish industry byproducts[J]. Marine Drugs, 2017, 15(5): 131.
 - [23] 曹少谦, 夏珊珊, 刘亮, 等. 马面鱼皮胶原蛋白的提取及其特性研究[J]. 中国食品学报, 2014, 14(10): 117-123.
CAO Shao-qian, XIA Shan-shan, LIU Liang, et al. Extraction and characterization of collagen from navodon septentrionalis skin[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2014, 14(10): 117-123.
 - [24] 陈涛, 李伟峰. 野生绿鳍马面鲈(*Navodon septentrionalis*)幼鱼、成鱼肌肉营养成分分析[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2018(17): 185-187.
CHEN Tao, LI Wei-feng. Analysis of nutritional components in the muscles of young and adult wild Navodon septentrionalis[J]. Heilongjiang Animal Science and Veterinary Medicine, 2018(17): 185-187.
 - [25] SADOWSKA M, KOŁODZIEJSKA I, NIECIKOWSKA C. Isolation of collagen from the skins of Baltic cod (*Gadus morhua*) [J]. Food Chemistry, 2003, 81(2): 257-262.
 - [26] RIGBY B. Amino-acid composition and thermal stability of the skin collagen of the Antarctic ice-fish [J]. Nature, 1968, 219(5 150): 166-167.
 - [27] KITTIPHATTANABAWON P, BENJAKUL S, VISESSANGUAN W, et al. Characterisation of acid-soluble collagen from skin and bone of bigeye snapper (*Priacanthus tayenus*) [J]. Food Chemistry, 2005, 89(3): 363-372.
 - [28] KIMURA S, OHNO Y. Fish type i collagen: Tissue-specific existence of two molecular forms, ($\alpha 1$)₂ $\alpha 2$ and $\alpha 1\alpha 2\alpha 3$, in alaska pollock[J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry, 1987, 88(2): 409-413.
 - [29] DUAN Rui, ZHANFG Jun-jie, DU Xiu-qiao, et al. Properties of collagen from skin, scale and bone of carp (*Cyprinus carpio*) [J]. Food Chemistry, 2009, 112(3): 702-706.
 - [30] SUN Lei-lei, HOU Hu, LI Ba-fang, et al. Characterization of acid- and pepsin-soluble collagen extracted from the skin of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2017, 99: 8-14.
 - [31] AMBIGAIPALAN P, AL-KHALIFA A S, SHAHIDI F. Antioxidant and angiotensin I converting enzyme (ACE) inhibitory activities of date seed protein hydrolysates prepared using Alcalase, Flavourzyme and Thermolysin[J]. Journal of Functional Foods, 2015, 13(B): 1 125-1 137.
 - [32] NAKCHUM L, KIM S M. Preparation of squid skin collagen hydrolysate as an antihyaluronidase, antityrosinase, and antioxidant agent[J]. Preparative Biochemistry & Biotechnology, 2016, 46(2): 123-130.
 - [33] KUMAR J P, MANDAL B B. Inhibitory role of silk cocoon extract against elastase, hyaluronidase and UV radiation-induced matrix metalloproteinase expression in human dermal fibroblasts and keratinocytes[J]. Photochemical & Photobiological Sciences, 2019, 18(5): 1 259-1 274.
 - [34] MAACHE-REZZOUG Z, PIERRE G, NOUVIAIRE A, et al. Optimizing thermomechanical pretreatment conditions to enhance enzymatic hydrolysis of wheat straw by response surface methodology[J]. Biomass and Bioenergy, 2011, 35(7): 3 129-3 138.
 - [35] KARKI B, MAURER D, KIM T H, et al. Comparison and optimization of enzymatic saccharification of soybean fibers recovered from aqueous extractions[J]. Bioresource Technology, 2011, 102(2): 1 228-1 233.